

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Marburg

(Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer)

KRITISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM
HISTOCHEMISCHEN PHOSPHATASE-NACHWEIS
AN LUNGENSCHNITTEN
TOT- UND LEBENDGEBORENER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von
Hans-Ulrich Ruthig
aus Finsterwalde

Marburg 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Druck- und Verlagsanstalt

Werner Blasaditsch · 89 Augsburg · Theodor-Heuß-Platz 3 · Telefon (0821) 25563

Printed in Germany

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Marburg

(Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer)

KRITISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM
HISTOCHEMISCHEN PHOSPHATASE-NACHWEIS AN
LUNGENSCHNITTEN TOT- UND LEBENDGEBORENER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von
Hans-Ulrich Ruthig
aus Finsterwalde

Marburg 1973



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 27. März 1973

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin

Direktor: Prof. Dr. H. Oepen, Dekan

Referent: Prof. Dr. F. Schleyer

Korreferent: Prof. Dr. P. Schmitz-Moormann

I n h a l t

	Seite
I. <u>Allgemeines zur Definition der Lebend- und Totgeburt</u>	1
I.1. Die Lungen	1
I.2. Der Magen	2
I.3. Der Nabel	2
II. <u>Die üblichen histologischen Untersuchungen der Neugeborenenlunge</u>	3
III. <u>Die Methode nach LO MENZO und CHIARA</u>	6
III.1. Chemie und Vorkommen der Phosphatase ..	6
III.2. Nachweis der alkalischen Phosphatase ..	7
III.3. Nachweis der sauren Phosphatase	8
III.4. Ergebnisse und Schlußfolgerungen von LO MENZO und CHIARA	8
IV. <u>Eigene Versuche</u>	10
IV.1. Vorversuche	10
IV.2. Die Anfertigung der Schnitte	12
V. <u>Das Verfahren nach FRIEDE und KNOLLER</u>	14
VI. <u>Hauptversuche und Ergebnisse</u>	16
Aufstellung der untersuchten Fälle	19
VII. <u>Zusammenfassung</u>	20
VIII. <u>Literatur</u>	21

I. Allgemeines zur Definition der Lebend- und Totgeburt

Nach § 29 der Verordnung zur Ausführung des Personenstandsgesetzes von 1959 gilt ein Kind als totgeboren oder in der Geburt verstorben, wenn bei ihm nach der Scheidung vom Mutterleib weder das Herz geschlagen, noch die Nabelschnur pulsiert, noch die natürliche Lungenatmung eingesetzt hat, die Leibesfrucht jedoch wenigstens eine Länge von 35 cm hat. Hat sich eines der genannten Merkmale gezeigt, so gilt das Kind ohne Rücksicht auf seine Körpergröße als lebendgeboren.

I.1. Die Lungen

Die nichtentfaltete kindliche Lunge hat eine mehr feste Konsistenz und eine glatte, grau-rötliche Oberfläche. Die Lungen liegen zurückgesunken im Thorax. Makroskopisch lassen sich nirgends Acini erkennen. Eine entfaltete Lunge füllt den Thoraxraum besser aus. Ihre Oberfläche ist hellgrau-rot. Man findet unscharf begrenzte, eingesunkene (atelektatische) Bezirke und daneben Abschnitte, in denen durch die Pleura die Acini dieser entfalteten Lungenpartie durchschimmern. Während man die Beschaffenheit der nichtentfalteten Lunge als mehr fleischig bezeichnen kann, ist die Konsistenz der entfalteten Lunge luftkissenartig. Die Luft kann aber, besonders wenn nur wenige Atemzüge getan wurden, noch postmortal resorbiert werden, so daß auch eine beatmete Lunge dann luftleer erscheinen kann.

Die Lungenschwimmprobe: Sie ist in Sektionsvorschriften angeordnet, die Beurteilung ist allerdings schwierig. Sind die Befunde bei einer frischen Lunge sicher positiv, dann kann das Ergebnis im Rahmen der Gesamtbeurteilung verwendet werden. Sobald Fäulnis ein-

getreten ist, oder es sich um eine Wasserleiche handelt, sind keine eindeutigen Aussagen mehr möglich. MUELLER meint, daß der Erfahrene auch noch bei faulen Organen an Hand der Fäulnisblasen gewisse Aussagen machen könne, ob das Kind geatmet hat oder nicht, aber eine einwandfreie diagnostische Bedeutung komme diesem Befund allein nicht zu.

I.2. Der Magen

Wenn das Neugeborene geatmet hat, enthält der Magen verschluckte Luft. Sie wird durch die Magen-Darm-Schwimmprobe nachgewiesen: Wenn es sich um eine schnelle, leichte Geburt in normaler Lage gehandelt hat, werden bei einer frischen Leiche erhebliche Mengen Luft im Magen und unter Umständen auch im Duodenum gefunden. Bei Fäulnis ist das Ergebnis nicht verwertbar.

Sind an dem Neugeborenen Wiederbelebungsversuche unternommen worden, dann ist eine Beurteilung der Magen-Darm-Schwimmprobe (und der Lungenschwimmprobe) nicht mehr möglich.

I.3. Der Nabel

Mikroskopisch ist unter Umständen nach einer demarkierenden periumbilikalen Entzündung zu suchen. Diese stellt eine vitale Reaktion dar, die schon wenige Stunden nach der Geburt einsetzt und ein längeres Überleben beweist. FOERSTER (1939/40) zweifelt die Verwertbarkeit dieses Befundes allerdings stark an.

II. Die üblichen histologischen Untersuchungen der Neugeborenenlunge

Bei der frischen Neugeborenenlunge könne man, so WEIMANN, verhältnismäßig einfach an Hand von Serienschnitten ein klares Bild der Entfaltung und damit über die Beatmung bekommen. Einschränkend wird gesagt, daß das Verhalten sämtlicher Bestandteile des Lungengewebes zu berücksichtigen, die Entfaltung der Alveolen und Bronchien aber doch am wichtigsten sei. WEIMANN fügt hinzu, daß die Veränderungen am elastischen Apparat der Lungen keine Bedeutung hätten, vor allem wegen ihrer meist schlechten Färbbarkeit in der faulen Lunge. Die Veränderungen seien zwar auch recht auffallend, aber sekundärer Natur.

BÖHMER betont dagegen, daß diese Veränderungen, gerade weil sie sekundärer Natur seien, darauf hindeuten, daß eine funktionelle Beanspruchung stattgefunden habe. Er bezieht sich auf Arbeiten von FOERSTER (1932), in denen festgestellt wird, daß man nach einer Elasticafärbung (nach Weigert) Aussagen über das Gelebehaben und zum Teil auch über die Todesursache machen könne. FOERSTER kam zu folgenden Ergebnissen: bei Luftatmung sind die elastischen Fasern gespannt und schmal im mikroskopischen Bild, bei Fruchtwasser-aspiration wellenförmig verlaufend und dick. In der faulen beatmeten Lunge zeigen sich keine elastischen Fasern als Begrenzung der Hohlräume in der Lunge, in der faulen unbeatmeten Lunge liegen die elastischen Fasern lockenförmig im Lungenparenchym. 1939/40 stellte FOERSTER nochmals fest, daß die elastischen Fasern in der fetalen Lunge lockenförmig verteilt liegen, während sie in der entfalteten Lunge bogenförmig verlaufen.

STAENMLER bestätigte diese Beobachtungen, weist aber zugleich darauf hin, daß die Menge der elastischen Fasern nicht von der Beatmung, sondern vom allgemeinen Entwicklungszustand des Fetus abhängig sei. Zu der gleichen

Auffassung kommt GOLD²³ REH, wenn er schreibt, daß die Lokalisation und Menge der elastischen Fasern in direkter Beziehung zur Reife der Frucht stehe und deshalb an der Neugeborenenleiche als Reifezeichen zu verwenden sei.

Sobald eine Lunge in Fäulnis übergegangen ist, ist man besonders auf die histologischen Untersuchungen angewiesen. Wie Experimente ergeben haben, besteht kein Unterschied in der Geschwindigkeit der Fäulnis beatmeter und unbeatmeter Lungen (SCHLEYER). Alle Autoren, zuletzt FOERSTER und GOLDBACH sowie REH betonen, daß Fäulnis keine entscheidenden Veränderungen an den elastischen Systemen verursacht. Damit erlange diese Untersuchung ausschlaggebende Beweiskraft. FOERSTER und GOLDBACH führen zusammenfassend aus, daß bei faulen, nichtentfalteten Lungen die elastischen Fasern als Bündel in Lockenform im Gewebe verstreut lägen. Bei in Fäulnis übergegangener Lunge mit Fruchtwasseraspiration sei die Lunge nicht völlig entfaltet, der Verlauf der elastischen Fasern ungespannt und wellenförmig um die Lungenbläschen herum. Die beatmete, in Fäulnis übergegangene Lunge enthalte die elastischen Fasern gestreckt, kreis- oder bogenförmig als Alveolarbegrenzung verlaufend.

Während FOERSTER und Andere Resorcin- oder Orceinfärbungen benutzten, um die elastischen Fasern anzufärben, verbesserte REH das Verfahren, indem er die Retikulinfasern mit der Silberimprägnierung nach Gomori sichtbar machte. Die Versilberungsmethode sei viel empfindlicher, als die herkömmliche Elasticafärbung und auch bei stärkerer Organfäulnis erhalte man mit der Gitterfaserstruktur ein getreues Abbild der Alveolarwände. Schon BALOTTA konnte nachweisen, daß das Retikularnetz seine Form fast unverändert beibehält, selbst wenn die Organe schon soweit gefault seien, daß ihr Bau mit den gewöhnlichen histologischen Methoden nicht mehr zu erkennen sei. Es ließen sich einzelne Organe sogar nach dem Aussehen des Retikulargewebes identifizieren. REH (1968) betont nochmals, daß jede funktionelle Veränderung, sei sie ventilatorischer oder hämodynamischer Art, sich auch strukturell an der Fasertextur bemerkbar mache.

Neueste Untersuchungen PROKOPs mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und Titangelbfärbung haben jedoch ergeben, daß das Aussehen der elastischen Fasern im Rahmen der Lebensproben nicht verwertbar sei, da es sich um Artefakte handle. Die elastischen Fasern unbeatmeter Lungen seien in unfixiertem Material ebenso bogenförmig gestreckt, wie die beatmeter Lungen. PROKOP erklärt dies so, daß durch die Fixierung Gewebsschrumpfung eintrete und die Fasern in diesen Schrumpfungsprozeß mit einbezogen werden könnten. Sie würden also offenbar passiv in die gewellte Lage gedrängt. Schließlich sei Fruchtwasser-aspiration ein häufiger, wenn auch nicht obligater Befund, was übrigens auch schon FOERSTER und GOLDBACH festgestellt haben. Deshalb, so PROKOP, sei die Fruchtwasser-aspiration nicht als Streckfaktor vorher angeblich gewellter elastischer Alveolarfasern anzusehen.

Damit wäre auch die bisher einzige, verhältnismäßig sichere "Lebensprobe" in Frage gestellt.

III. Die Methode nach LO MENZO und CHIARA

Mit Hilfe dieses Verfahrens soll es möglich sein, histochemisch festzustellen, ob ein tot aufgefundenes Neugeborenes post partum gelebt hat oder nicht. Die Methode beruht auf dem Nachweis der sauren und alkalischen Phosphatase in Haut, Lunge, Leber und Niere. Da das Enzym erst mit der Geburt aktiv werde, sei hier die Möglichkeit einer Lebensprobe gegeben. Für die Lunge würde das bedeuten: mit dem ersten Atemzug sei eine Enzymaktivität nachweisbar.

III.1. Chemie und Vorkommen der Phosphatase

Die Phosphoesterasen oder Phosphatasen gehören zur Gruppe der Hydrolasen, sie spalten die Esterbindung zwischen Phosphat und alkoholischem Rest:



Man findet das Enzym ziemlich häufig im Organismus. Außer in der Lunge ist es anzutreffen: in den Epithelien der proximalen Nierentubuli, im Kutikularsaum der Dünndarm-epithelien, in den Kapillaren der Endstrombahn und in den Gallekapillaren. Man nimmt an, daß es überall dort vorkommt, wo Transportmechanismen zu bewältigen, wo also resorptive und exkretorische Leistungen an Grenzmembranen notwendig sind. Die alkalische Phosphatase wird mit den Sekreten von Leber, Pankreas, Speicheldrüsen und Mamma sezerniert. Über die Aufgaben der Phosphatasen im Organismus ist noch sehr wenig bekannt. Eine Ausnahme machen nur die Phosphatasen die energiereiche Bindungen spalten. Ein vermehrtes Auftreten der Phosphatasen ist an Stellen mit verstärktem Wachstum zu beobachten, etwa am Knochen von Jugendlichen, aber auch an Geschwülsten und an heilenden Wundrändern der Haut.

III.2. Nachweis der alkalischen Phosphatase

Die Nachweismethoden beruhen auf der Darstellung eines der beiden Reaktionsprodukte, der Phosphorsäure oder des alkoholischen Restes. LO MENZO und CHIARA weisen den alkoholischen Rest mit Hilfe der "simultanen Azokupplung" nach: Enzymatisch wird durch die Phosphatase aus einem Substrat, hier Na- α -naphthylphosphat, eine Phenolverbindung freigesetzt. Diese reagiert mit einem Diazoniumsalz. Es tritt eine Ausfällung und Anfärbung ein. Der entstandene Farbstoff ist ein unlöslicher Azofarbstoff. Bei der Ausfällung wird der Stickstoff des Diazoniumsalzes abgespalten und gasförmig frei.

Als Diazoniumsalze werden empfohlen (PEARSE und GROGG, PIOCH, LO MENZO und CHIARA, RAEKALLIO):

Fast Violet B (Echtviolett B)
Fast Black B (Echtschwarz B)
Fast Red TR (Echtrot TR)
Fast Blue RR (Echtblau RR).

LO MENZO und CHIARA geben folgende Technik für den Nachweis der alkalischen Phosphatase an:

- a) Gewebsstücke 10 Stunden in 10%igem Formalin fixieren.
- b) Herstellen von 15 μ dicken Gefrierschnitten.
- c) Schnitte in physiologischer Kochsalzlösung auftauen lassen, danach 10 min bei 20°C in 0.2 M "Tris"-Puffer, pH 10, der 0.1% Na- α -naphthylphosphat und 0.1% Fast Violet B (Diazoniumsalz des 6-Benzol-amino-4-methoxy-metatoluidins) enthält.

Die Lösung muß kurz vor Gebrauch angesetzt werden, um Selbstoxidation zu vermeiden. Umrühren, filtrieren, um Niederschläge auszuschließen.

- d) Die Schnitte 3 min in Aqua dest. wässern und in Glyzeringelatine einbetten.

Die Enzymaktivität zeigt sich in den Präparaten als braun-schwarze Agglomerationen im Gewebe. Eine Betrachtung

mit stärkerer Vergrößerung führt zu keinen genaueren Ergebnissen, da der ausgefällte Azofarbstoff meistens klumpig erscheint. Zellgrenzen sind nicht mehr auszumachen. Das übrige Lungengewebe ist hell- bis mittelbraun angefärbt.

III.3. Nachweis der sauren Phosphatase

Im Prinzip wird die saure Phosphatase nachgewiesen wie die alkalische: mit Hilfe der "simultanen Azokupplung" wird der alkoholische Rest aus der hydrolytischen Spaltung nachgewiesen.

Als Diazoniumsalz empfehlen LO MENZO und CHIARA Fast Garnet GBC.

Die von LO MENZO und CHIARA angegebene Technik ist analog der zum Nachweis der alkalischen Phosphatase, es besteht nur ein Unterschied bei

c) Schnitte auftauen lassen, danach 10 min bei 20°C in 0.1 M Veronalazetatpuffer, pH 5, der 0.1% Na- α -naphthylphosphat und 0.1% Fast Garnet GBC enthält. Umrühren und filtrieren, um Niederschläge zu vermeiden.

Die Zonen der Enzymaktivität sind dunkelrot angefärbt.

III.4. Ergebnisse und Schlußfolgerungen von LO MENZO und CHIARA

Die Untersuchungen wurden an 25 Neugeborenen verschiedener Entwicklungsstufen vorgenommen. Es wurden nur Fälle untersucht, bei denen die Tatsache der Lebend- oder Totgeburt eindeutig war. Die Autopsie wurde 36-48 Stunden nach dem Tode gemacht.

Die Enzymtätigkeit zeigte ihre größte Aktivität bei Lebendgeborenen, und zwar konstant in allen untersuchten Fällen. Die Enzymaktivität fehlte völlig in den Fällen

ohne Atmung. Man könne vermuten, daß die Atmung für die örtliche Vermehrung der metabolischen Aktivität des Pulmonalparenchyms verantwortlich sei, was sich in der vermehrten Aktivität des Enzyms zeige. Weiter weisen LO MENZO und CHIARA auf den offensichtlichen Zusammenhang zwischen "Stress" unter der Geburt und der dadurch bedingten Steigerung der Phosphatase-Aktivität hin.

Außer an der Lunge führten LO MENZO und CHIARA den Phosphatase-Nachweis an der Haut, der Leber und der Niere. Die Ergebnisse in allen vier Organen glichen sich, die Enzymtätigkeit sei erst sicher mit dem Beginn des extra-uterinen Lebens nachweisbar.

Schließlich betonen sie, daß die Grenze der Methode darin bestehe, daß nur frisches Material benutzt werden könne, das nicht älter als 3 Tage sein dürfe, dann aber stelle das Verfahren wohl eine diagnostische Hilfe für die Rechtsmedizin dar.

IV. Eigene Versuche

Die vorliegende Arbeit befaßt sich nur mit dem Nachweis der alkalischen Phosphatase im Lungenparenchym. Der Nachweis der sauren Phosphatase geschieht ja in analoger Weise, nur mit einem anderen Diazoniumsalz bei einem sauren pH. Schließlich lassen es die Ergebnisse von LO MENZO und CHIARA gerechtfertigt erscheinen, aus der Verwendbarkeit des Verfahrens an einem Organ Rückschlüsse auf die generelle Anwendbarkeit der Methode zu ziehen.

Bei Fermentreaktionen muß allgemein beachtet werden, daß die angebotene Substratmenge in vivo den Umsatz durch das Enzym begrenzt. Die Menge des angebotenen Substrates bestimmt also das Ausmaß der Reaktion. In vitro wird Substrat stets im Überschuß zugegeben. Man muß daher die Reaktion zeitlich begrenzen, um einen optimalen Erfolg zu erzielen. Weiter ist zu beachten, daß Fermente am besten bei ihrem Temperaturoptimum (meistens 37°C), und im Bereich ihres pH-Optimums arbeiten, (das für die alkalische Phosphatase bei Werten über oder gleich pH 9 liegt).

IV.1. Vorversuche

a) Fixierungsmittel: neutrales Formalin, 10%ig, sog. "Baker-Formol".

Herstellung (PIOCH):

- A. 100 ml 37-40%iges Formalin,
900 ml Aqua dest.,
einige Stückchen Kalziumkarbonat,
nach dem Mischen filtrieren und mit HCl auf
pH 7 einstellen; oder
- B. 20 ml 37-40%iges Formalin,
180 ml Aqua dest.,
1.9 g Natriumazetat,
nach dem Mischen filtrieren und mit HCl auf

pH 7 einstellen.

b) Substrat: Natrium- α -naphthylphosphat (Schuchardt), parallel wurde auch Di-Natrium- α -naphthylphosphat (Serva) verwendet.

c) Farbstoffe: eines der oben angegebenen Diazoniumsalze (Echtrot TR und Echtblau RR).

d) Puffer: 0.2 M "Tris"- (=THAM-) Puffer, pH 10:

6.056 g "Tris" (Trishydroxymethyl-aminomethan),

500 ml Aqua dest.,

mit NaOH auf pH 10 einstellen.

Nach PIOCH wurde gleichzeitig ein zweiter Puffer benutzt:

0.1 M Veronalazetatpuffer, pH 9.2:

9.714 g Natriumazetat,

14.717 g Veronalnatrium,

Aqua dest. ad 500 ml.

Ansatz für pH 9.2:

50 ml dieser Veronalazetatlösung,

20 ml physiologische Kochsalzlösung,

2 ml 0.1 n HCl,

178 ml Aqua dest.

e) Einbettungsmittel: Glyzeringelatine (nach Kaiser).

Wenn kein Fertigpräparat verwendet wird, nach folgendem Rezept (RAEKALLIO):

40 g Gelatine für 2 Stunden in 210 ml Aqua dest. quellen lassen, 250 ml Glyzerin und 5 ml wässriges Phenol dazugeben, unter Umrühren vorsichtig 15 min im Wasserbad erwärmen. Im Kühlschrank aufbewahren.

Die pH-Werte wurden mit einem pH-Meter gemessen und notfalls berichtigt. Die fixierten Gewebsstücke wurden mit Kohlensäureschnee eingefroren, es wurden 16 μ dicke Schnitte im Kryostaten angefertigt. Beim Aufziehen der Schnitte zeigte es sich, daß das Auftauen in physiologischer Kochsalzlösung ungünstig war, da das Kochsalz nach dem Trocknen Rückstände auf dem Objektträger zurückließ. Deshalb wurde Aqua dest. als Auftauflüssigkeit benutzt.

IV.2. Die Anfertigung der Schnitte

Das fixierte Gewebsstück wurde vor dem Schneiden mindestens 2 Stunden unter fließendem Wasser gewässert. Es wurden von jedem Block mehrere Schnitte von 16μ Dicke angefertigt. Nach dem Auftauen wurden sie auf Objektträger aufgezogen und mindestens 30 min ohne Haftmittel ange-trocknet. Bei einer kürzeren Trocknungszeit bestand die Gefahr des Abschwimmens beim späteren Inkubieren. Die Inkubationslösung wurde jeweils frisch zubereitet:

- 80 ml 0.2 M "Tris"-Puffer,
- 80 mg Na- α -naphthylphosphat,
- 80 mg Fast Blue RR.

Vor der Verwendung wurde die Lösung filtriert.

Die Schnitte wurden 90 min bei 37°C inkubiert. Es zeigte sich, daß bei zu kurzer Inkubationszeit die Reaktion erst unvollständig abgelaufen war, und daß nach zu langer Verweildauer das Präparat zu dunkel angefärbt wurde, so daß Einzelheiten nur noch schwer zu erkennen waren.

Das von LO MENZO und CHIARA angegebene Wässern von 3 Minuten in Aqua dest. erwies sich als zu kurz, die Reaktion wurde nicht abgestoppt. Nach dem Trocknen und Einbetten bildeten sich Gasblasen (Stickstoff), die im Laufe der ersten Tage noch an Zahl zunahmen. MEIER-RUGE und MEIER geben für diesen Fall an, das Präparat nach der Diazofärbung für 15 Minuten in folgende Lösung zu legen:

- 100 ml 1 n HCl,
- 12 g Aluminiumchlorid wasserhaltig ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

Es darf wegen der Explosionsgefahr bei der Berührung mit Wasser kein wasserfreies AlCl_3 verwendet werden.

Anschließend soll unter fließendem Wasser gut gewässert werden. Wie die Versuche ergaben, empfiehlt es sich, zum Schluß noch 5 Minuten in Aqua dest. zu wässern, da sonst von dem fließenden Leitungswasser her Luftblasen am Präparat haften bleiben.

Vor dem Einbetten müssen die Schnitte bei Raumtemperatur gut antrocknen. Für das Einbetten mit Glyzerin-gelatine hat es sich als praktisch erwiesen, die Deckgläser vorher anzuwärmen. So erhält man weitaus weniger Luftblasen im Präparat, da ohnehin beim Einbetten mit Glyzerin-gelatine Luftblasen selten ganz zu vermeiden sind. Nach 1 - 2 Tagen waren die Luftblasen aber meistens verschwunden. Die Glyzerin-gelatine wird im Kühlschrank aufbewahrt, und zur Verwendung nur eine kleine Menge entnommen und bis zum Flüssigwerden erwärmt. Auf diese Weise hielt sich die Glyzerin-gelatine länger, als wenn jedesmal der gesamte Vorrat erwärmt wurde.

Als Substrat wurde zunächst parallel, später wahlweise, $\text{Na-}\alpha\text{-naphthylphosphat}$ und $\text{Na}_2\text{-}\alpha\text{-naphthylphosphat}$ verwendet. Es waren keine Unterschiede im Ergebnis festzustellen. Die erzielten Ergebnisse waren aber nicht voll zufriedenstellend, da immer auch das Parenchym angefärbt wurde. So waren die Stellen der Enzymaktivität oftmals schlecht auszumachen. Daher wurde eine Variation der Färbung erprobt:

V. Das Verfahren nach FRIEDE und KNOLLER

Nach der Fixierung in 10%igem Formalin Anfertigung von 16 μ dicken Gefrierschnitten und anschließende Inkubation. Die Inkubationslösung besteht aus

- 1 ml 0.1 M "Iris"-Puffer, pH 10,
- 1 mg 5-Chlor-o-Toluidin,
- 1 mg Na- α -naphthylphosphat.

Statt 0.1 M "Tris"-Puffer wurde auch der 0.2 M "Tris"-Puffer und daneben der 0.1 M Veronalazetatpuffer, pH 9.2, verwendet. Nach der Anweisung soll der Schnitt unter Schütteln bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert werden. Das Reaktionsvolumen sollte möglichst groß sein, die Reaktion soll durch Zugabe von Formalin abgebrochen werden.

Die Färbung mit 5-Chlor-o-Toluidin statt mit einem Diazoniumsalz hat den Vorteil, daß der Schnitt selbst ungefärbt bleibt, nur an den Stellen der Phosphatase-Aktivität entsteht ein Farbstoff. Ein Durchmustern ist daher leichter möglich. Allerdings konnte auch dieses Verfahren nicht ohne Abwandlungen verwendet werden. Durch Versuche ließ sich ermitteln, daß eine Inkubation über 1 Stunde bei 37°C notwendig war, um bei beatmeten Lungen von Erwachsenen sicher einen positiven Nachweis zu bekommen.

Die Inkubationslösung muß auch hier frisch bereitet werden. Das 5-Chlor-o-Toluidin ist nur in der Hitze voll löslich. Deshalb mußte der Puffer kurz erwärmt werden, bis der Farbstoff völlig gelöst war, dann wurde das Substrat zugegeben. Danach wurde sofort filtriert, und zwar in einem Gefäß, das in kaltem Wasser stand, denn die Schnitte sollten bei nicht mehr als 37°C inkubiert werden. Die Reaktion wurde durch Einbringen der Schnitte für 10 - 15 Minuten in Formol abgestoppt. Auch die Lösung nach MEIER-RUGE und MEIER schien zum Abbremsen der Reaktion geeignet zu sein. Anschließend wurde gewässert, bei Formol etwa 10 - 15 Minuten in Aqua dest., bei der Lösung aus HCl und $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ausgiebig unter fließendem Wasser und noch etwa 5 Minuten in Aqua dest. Nach Antrocknung der Schnitte Einbettung in Glycerin-

gelatine. Man erhält dabei keine Dauerpräparate, die Schnitte blassen im Laufe von Monaten ab.

LO MENZO und CHIARA geben als Diazofarbstoff das Salz an. Bei der Reaktion mit Na- α -naphthylphosphat wird Stickstoff frei, der die Gasblasen bewirkt, die sich bei nicht völlig abgestoppter Reaktion noch nach dem Einbetten bilden können. FRIEDE und KNOLLER verwenden stattdessen die Base, also die Vorstufe des Salzes, und bekommen kaum Gasentwicklung. Schließlich scheint sich der stabilisierende Faktor $ZnCl_2$ des Diazosalzes oder auch die Stickstoffbildung am Schnitt so auszuwirken, daß das gesamte Gewebe gleichmäßig braun tingiert wird. Bei Verwendung der Base fehlt diese Anfärbung.

Die beiden Methoden nach LO MENZO und CHIARA und nach FRIEDE und KNOLLER stimmen also grundsätzlich überein, unterscheiden sich aber im verwendeten Farbstoff. Eine Farbstoffgleichheit könnte man fälschlicherweise aus einer Aufstellung von PIOCH herauslesen.

VI. Hauptversuche und Ergebnisse

Untersucht wurden 21 Fälle, davon 12 Totgeburten (nach Angaben der Klinik), 1 Fetus und 8 Neugeborene, die sicher geatmet hatten ^x).

Die Dauer der natürlichen Atmung hatte zwischen wenigen Minuten und 12 Stunden geschwankt, 1 Neugeborenes war 8 Wochen alt.

Im Durchschnitt waren die Totgeburten 45 cm lang und zwischen 600 und 4080 g schwer. Soweit es sich feststellen ließ, waren 5 Totgeburten noch unreif, laut Sektionsprotokoll wiesen 4 Fälle Mazerationen auf.

Es wurden jeweils von beiden Lungen aus verschiedenen Stagen Proben entnommen. Da sich die Untersuchungen über 10 Monate hinzogen, wurde der Puffer mehrfach erneuert. Es wurden zum Teil parallel Untersuchungen mit "Tris"-Puffer und mit Veronalazetatpuffer, sowie mit den Färbungen nach LO MENZO und CHIARA und nach FRIEDE und KNOLLER gemacht. Die Ergebnisse waren immer übereinstimmend.

Bei den Totgeburten war keine Phosphatase-Aktivität feststellbar. Diese Aktivität war sonst bei einer Vergrößerung von 1:125 erkennbar in Form schwarzbrauner, leicht gebogener Stäbchen in dem sonst ungefärbten und auch wegen der Dicke der Schnitte leicht unscharfen mikroskopischen Bild. Ein gehäuftes Auftreten an bevorzugter Stelle, etwa in Kapillarnähe oder in der Nähe der Bronchien, ließ sich nicht feststellen.

Die Unterscheidung von Schmutzpartikeln war schon von der Form her möglich. Kleinste Lufteinschlüsse in der

^x) Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof.Dr.W. H o r t , Direktor des Pathologischen Institutes der Universität Marburg, sowie Herrn Prof.Dr.H. G i r g e n s o h n , Direktor des Institutes für Pathologie I der Bundesknappschaft in Essen-Steele für die Überlassung des Materials.

Glyzeringelatine ließen sich durch Spiel mit der Mikrometerschraube erkennen, bei Luftbläschen sah man zudem eine zentrale Aufhellung in den meist kreisrunden Gebilden.

Der Aktivitätsnachweis konnte an Erwachsenenlungen deutlich erbracht werden, wobei hier wegen vielleicht vorhandener Anthrakose sehr sorgfältig vorgegangen werden mußte. Das anthrakotische Pigment lag jedoch immer zusammengeballt vor, während an den Stellen von Phosphatase-Aktivität die Stäbchen immer einzeln lagen, sich zum Teil überlagerten, aber nie verschmolzen. An Formolpigment zu denken, schied aus, da durchgehend alle Präparate von Totgeburten, die ebenfalls mit Formol fixiert wurden, keinerlei Anfärbung zeigten. Außerdem wurde ja das fixierte Gewebsstück zur Vermeidung von Formolpigment mindestens 2 Stunden unter fließendem Wasser gewässert.

Der Aktivitätsnachweis, der bei der Erwachsenenlunge ohne Schwierigkeiten möglich war, ließ sich dagegen an der Neugeborenenlunge erst nach einiger Lebenszeit erbringen. Sicher nachweisbar war die Phosphatase erst nach 8 Stunden Atmung, jedoch nur in geringen Mengen. Das kann allerdings am Alter des Materials liegen, da es frühestens 36 Stunden nach der Geburt zur Bearbeitung zur Verfügung stand. Es wurde dann in jedem Fall sofort bearbeitet, um die 3 Tage-Frist nicht zu überschreiten, die LO MENZO und CHIARA angeben. Mit beiden Färbemethoden war aber bis zu einer Lebenszeit von 8 Stunden keine Aktivität der alkalischen Phosphatase nachweisbar. Offensichtlich setzt also die Aktivität nicht sofort mit dem ersten Atemzug ein, jedenfalls ist die Konzentration des Enzyms nicht hoch genug, als daß es nachweisbar wäre.

Bei allen diesen Untersuchungen muß daran gedacht werden, daß der histochemische Enzyminachweis eine Reaktion ist, die einen Schwellenwert besitzt, d.h. erst ab einer gewissen Konzentration an Substrat oder Enzym wird die Reaktion positiv. Daher läßt sich ein negativer Fermentnachweis

nur so deuten, daß das Ferment nicht in ausreichender Menge vorhanden war, dabei braucht es aber nicht völlig zu fehlen, seine Konzentration liegt nur noch unter dem Schwellenwert.

Die Aufstellung (Tabelle) unterrichtet über das Gesamtergebnis.

Fall	Lebensdauer	Todesursache	Phosphatase-Reaktion
1	Fetus	Intrauteriner Fruchttod	negativ
2	Totgeburt	Nabelschnurumschlingung	negativ
3	Totgeburt	Retroplazentarehämatom	negativ
4	Totgeburt	Nabelschnurvorfall	negativ
5	Totgeburt	Placenta-Insuffizienz	negativ
6	Totgeburt	Vorzeitige Placentalösung	negativ
7	Totgeburt	Schwangerschaftsgestose	negativ
8	Totgeburt	Infarzierung der Placenta	negativ
9	Totgeburt	Intrauteriner Fruchttod	negativ
10	Totgeburt	Hirnblutung	negativ
11	Totgeburt	Intrauteriner Fruchttod bei EPH-Gestose	negativ
12	Totgeburt	Vorzeitige Placentalösung, retroplazentares Hämatom	negativ
13	Totgeburt	Hypoplastische Placenta	negativ
14	Einige Atemzüge	Fruchtwasser-aspiration	negativ
15	20 Minuten	Mißbildungen, Herz-Kreislauf-Versagen	negativ
16	25 Minuten	Mißbildungen	negativ
17	3 Stunden	Hirnblutung	sicher negativ
18	4 Stunden	Fruchtwasser-aspiration, Frühgeburt	nicht mit Sicherheit positiv
19	8 Stunden	Respiratorische Insuffizienz, Rh-Inkompatibilität	sicher positiv
20	12 Stunden	Mongolismus, Fruchtwasser-aspiration	sicher positiv
21	8 Wochen	Herz-Kreislauf-Versagen	sicher positiv

VII. Zusammenfassung

Es wurde das von italienischen Autoren 1966 angegebene Verfahren zum Nachweis einer Beatmung am Lungengewebe Neugeborener durch histochemische Anfärbung der alkalischen Phosphatase nachgeprüft. In Vorversuchen wurde zunächst die optimale Methodik ermittelt. Sodann wurden die Lungen von 12 Totgeburten, 8 nach der Geburt verstorbenen Neugeborenen und 1 Fetus untersucht, ferner zum Vergleich Präparate von 7 Erwachsenenlungen. Während die Lungen der Totgeburten in der Tat keine und die Erwachsenenlungen immer eine deutliche Aktivität zeigten, ließ sich im Gegensatz zu den Literaturangaben der Fermentnachweis erst nach 8 Stunden Atmung sicher erbringen. Offenbar setzt also diese Aktivität nicht sofort mit dem ersten Atemzug ein. Damit hat die Methode für die rechtsmedizinische Diagnostik nur einen begrenzten Wert.

VIII. L i t e r a t u r

BALOTTA, F.: L'architettura del tessuto reticolare argentofilo nella identificazione di organi putrefatti. Arch.Antropol.crimin. 57, Suppl.-H., 241, 1937; Ref.Z.gerichtl.Med. 29, 78, 1938

BÖHMNER, K.: Beitrag zur histologischen Lungenprobe. Z.gerichtl.Med. 20, 396, 1933

FOERSTER, A.: Die Bedeutung der histologischen Lungenproben in der gerichtlichen Medizin. Z.gerichtl.Med. 18, 507, 1932

FOERSTER, A.: Die Bedeutung des elastischen Systems der Lungen in der gerichtlichen Medizin. Z.gerichtl.Med. 25, 208, 1935

FOERSTER, A.: Die gerichtlich-kriminalistischen Gesichtspunkte bei der Untersuchung der Kindstötung. Z.gerichtl.Med. 32, 283, 1939/40

FOERSTER, A. und H. GOLDBACH: Der heutige Stand der histologischen Lungenproben unter besonderer Berücksichtigung der elastischen Faserfärbung. Z.gerichtl.Med. 45, 386, 1956

FRIEDE, R. and M. KNOLLER: Quantitative tests of histochemical methods for phosphomonoesterases in brain tissue. J.Histochem.Cytochem. 13, 125, 1965; Ref.Z.anal.Chem. 223, 316, 1966

GOLDBACH, H.: Die Entwicklung der elastischen Fasern in der menschlichen Lunge. Z.gerichtl.Med. 45, 381, 1956

LO MENZO, G. e A. CHIARA: In tema di goduta vita extrauterina, Nota 1: L'attività fosfatasica alcalina e acida. Med.leg. 14, 313, 1966

MEIER-RUGE, W.: Anwendung und Aussagewert der Ferment-histochemie in der speziellen und experimentellen Pathologie. Med.Lab. 18, 193, 214, 1965

MEIER-RUGE, W. und E. MEIER: Zur Methodik der Artefaktaussschaltung bei Anwendung von Diazoniumsalzen in der Histochemie (Phosphatasen, Esterasen usw.). Experimenta 19, 266, 1963; zit. nach
M. ARNOLD: Histochemie, Berlin usw. (Springer) 1968

MÜLLER, B.: Gerichtliche Medizin, Berlin usw. (Springer) 1953

PEARSE, A. and E. GROGG: Coupling azo dye methods for histochemical demonstration of alkaline phosphatase. Nature 170, 578, 1952; zit.nach FIOCH 1966

PIOCH, W.: Die histochemische Untersuchung thermischer Hautschäden und ihre Bedeutung für die forensische Praxis, Lübeck (Schmidt-Römhild) 1966

PIOCH, W.: Briefliche Mitteilung 1968

PROKOP, O.: Zur Brauchbarkeit der elastischen Fasern der Lunge im Rahmen der Lebensproben. Z.Rechtsmedizin 69, 185, 1971

RAEKALLIO, J.: Die Altersbestimmung mechanisch bedingter Hautwunden mit enzymatischen Methoden, Lübeck (Schmidt-Römhild) 1965

REH, H.: Neue Untersuchungsmethoden beim Ertrinkungstod. Z.gerichtl.Med. 63, 134, 1968

REH, H.: Der Beweiswert der histologischen Lungenprobe beim Neugeborenen. Beitr.gerichtl.Med. 25, 79, 1969

SCHLEYER, F.: Die Fäulnisveränderungen im Lungenepithel des Neugeborenen. Beitr.gerichtl.Med. 19, 135, 1952

STAEMMLER, E.: Die Bedeutung der elastischen Fasern in den Lungenalveolen Neugeborener für Klinik und gerichtlich-medizinische Beurteilung. Z.gerichtl.Med. 25, 202, 1935

WEIMANN, W.: Zur histologischen Untersuchung der Neugeborenenlunge. Z.gerichtl.Med. 12, 309, 1928

Herrn Prof. Dr. Schleyer danke ich für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung bei der Ausarbeitung.

Den Herren Dr. R. Hilgermann und Dipl.-Chemiker G. Kamm, beide am Institut für Rechtsmedizin Marburg, gilt mein Dank für die Beratung bei technischen und chemischen Fragen.

keine akademischen Lehrer waren in Marburg
die Herren Professoren und Dozenten:

berendes, Bommer, Dölle, Eissner, Exner, Friederich,
Ganz, Hamelmann, Hamm, Hardewig, Hennessen, Hort,
Jacob, Kaffarnik, Koransky, Kunz, Linneweh, Martini,
Neswetha, Oehmig, Portig, Pots, Rodeck, Rohen, Schiff,
Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Schönhärl, Seidel,
Siegert, Siess, Streicher, Strohmeyer, Uhlarik, Voss

in Innsbruck: Baumgartner, Berger, Braunsteiner,
Ganner, Heinz, Hörbst, Huber, Kirchmair, Konzett,
Mehnert, Platzgummer, Probst, Rössler, Scharfetter,
Papfer, Wense, Wunderer

in Lübeck: Berndt, Feiereis, Henkel, Jeckeln, Klein-
schmidt, Ohlenroth, Ritter, Rudolph, Schlachetzki,
Schmid, Schmidt, Wegener

in Münster: Baumeister, Becher, Bier, Suddecke,
Caspers, Eichner, Flitsch, Hellenthal, Kappler,
Knoche, Lerche, Menne, Micheel, Pieper, Reimer,
Rollhäuser, Roths Schuh, Schäfer, Schütz

Lebenslauf

Am 17. Dezember 1945 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. Hans Ruthig und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Schumacher in Finsterwalde, Kreis Luckau geboren. Nach viereinhalb Grundschuljahren in Berlin (Ost) übersiedelten meine Eltern mit mir 1957 in die Bundesrepublik. In Essen besuchte ich zunächst das Goethe-Gymnasium, dann das neusprachliche Gymnasium Essen-Werden. Um auf eine mathematisch-naturwissenschaftliche Schule zu kommen, wechselte ich 1960 zum Helmholtz-Gymnasium, wo ich 1966 die Reifeprüfung bestand. Ich konnte in Münster sofort mit meinem Medizinstudium beginnen. Hier legte ich 1967 die naturwissenschaftliche und 1969 die ärztliche Vorprüfung ab. Nach einem Sommersemester in Lübeck setzte ich mein klinisches Studium für zwei Semester in Innsbruck fort. Seit dem Wintersemester 1970 war ich an der Universität Marburg immatrikuliert. Hier bestand ich am 18. Januar 1973 die ärztliche Prüfung. Seit dem 15. März 1973 bin ich als Medizinalassistent am Knappschafts-krankenhaus Dortmund-Brackel beschäftigt.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: "Kritische Untersuchungen zum histochemischen Phosphatase-Nachweis an Lungenschnitten Tot- und Lebendgeborener" im Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. F. Schleyer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung der Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg/Lahn, den 27. März 1973

Hans-Wilhelm Rulwig

